

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-020130

(43)Date of publication of application : 24.01.1995

(51)Int.Cl. G01N 33/552
C12Q 1/68
G01N 33/545
G01N 33/548
// C12N 11/02

(21)Application number : 05-191738

(71)Applicant : CHISSO CORP

(22)Date of filing : 05.07.1993

(72)Inventor : WAKAMOTO HIROAKI

(54) METHOD AND APPARATUS FOR DETECTING TRACE SUBSTANCE

(57)Abstract:

PURPOSE: To shorten the inspection time while simplifying the operation through the use of microcarriers produced by fixing an antibody, an antigen, an enzyme or polynucleotide to the surface of finely ground glass fiber, for example.

CONSTITUTION: A functional group, e.g. an amino group or a carboxyl group, is introduced onto the surface of nonporous microcarriers having large specific surface area and then an antibody, an antigen, an enzyme or polynucleotide is fixed to the surface thereof. When an antibody having a carboxyl group (amino group) is fixed, for example, microcarriers introducing an amino group (carboxyl group) is employed properly and the fixing is effected by forming a peptide bond using carbodiimide. When this microcarriers are employed, binding time of a substance exhibiting affinity to the substance fixed to the surface can be shortened and the inspection is finished in a short time by removing free bond substance. Furthermore, operation can be simplified by encapsulating the substance fixed to the surface and the substance exhibiting affinity thereto in one vessel.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-20130

(43) 公開日 平成7年(1995)1月24日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/552		9015-2 J		
C 1 2 Q 1/68	A	9453-4 B		
G 0 1 N 33/545	A	9015-2 J		
33/548	A	9015-2 J		
// C 1 2 N 11/02				

審査請求 未請求 請求項の数8 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平5-191738	(71) 出願人	000002071 チッソ株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号
(22) 出願日	平成5年(1993)7月5日	(72) 発明者	若本 裕晶 神奈川県横浜市金沢区乙舩町10番1-107号
		(74) 代理人	弁理士 野中 克彦

(54) 【発明の名称】 微量物質を検出する方法および器具

(57) 【要約】

【目的】 本発明は酵素免疫測定法による微量物質の検出、酵素活性検査、DNAプローブ法によるポリヌクレオチドの検出を短時間で簡便かつ高感度に行う方法と器具を提供することにある。

【構成】 微粉碎されたガラス繊維、セルロース系繊維または合成繊維の表面に抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドが固定化された微小担体及び該微小担体および該微小担体と親和性を有する少なくとも1つの物質に酵素あるいは放射性同位体あるいは蛍光物質を結合させた物質との相互作用を利用することにより、標的物質を検出する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 微粉碎されたガラス繊維、セルロース系繊維または合成繊維の表面に抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドが固定化された微小担体。

【請求項 2】 請求項 1 記載の微小担体と親和性を有する少なくとも 1 つの物質に酵素あるいは放射性同位体あるいは蛍光物質を結合させた物質と請求項 1 記載の微小担体との相互作用を利用することにより、標的物質を検出する方法。

【請求項 3】 微小担体に固定化された酵素と該酵素に対する基質との相互作用を利用することにより標的物質を検出する方法。

【請求項 4】 抗体もしくは抗原が固定化された請求項 1 記載の微小担体および抗原酵素複合体もしくは抗体酵素複合体に検体液を加えて競合的酵素免疫反応を行い、ついで該微小担体と未結合の抗原酵素複合体もしくは抗体酵素複合体とを分離し、該微小担体に発色基質液を滴下する事により、発色の有無を確認し、検体液中に抗体と特異的に結合する物質が存在するか否かを検出する方法。

【請求項 5】 抗体が固定化された微小担体および抗体酵素複合体に検体液を加えてサンドイッチ酵素免疫反応を行い、ついで該微小担体と遊離の抗体酵素複合体とを分離し、該微小担体に発色基質液を滴下する事により発色の有無を確認し、検体液中に抗体と特異的に結合する物質が存在するか否かを検出する方法。

【請求項 6】 微小担体表面に酵素が固定化された請求項 1 記載の微小担体に検体液および発色基質液を加え、ついで該微小担体をフィルターでろ過し、フィルター上の微小担体表面の発色の有無を確認し、検体液中に標的物質が存在するか否かを検出する方法。

【請求項 7】 標的ポリヌクレオチドに対し塩基結合部位の異なる 2 種のポリヌクレオチドのうちの 1 種が固定化された請求項 1 記載の微小担体と、酵素標識したもう一方のポリヌクレオチドとに検体液を加えて標的ヌクレオチドと融合させたのち、該微小担体をろ過して融合されていない酵素標識ポリヌクレオチドを除去し、ついで該微小担体に発色基質液を滴下する事により発色の有無を確認し、検体液中に認識されるべき配列のポリヌクレオチドが存在するか否かを検出する方法。

【請求項 8】 請求項 1 で示した微小担体、該微小担体表面に固定化された物質と親和性を有する物質を内封した容器、発色基質を入れた容器および該微小担体を捕捉しうるフィルターとからなる検査用キット

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は酵素免疫測定法による微量物質の検出、酵素活性検査または DNA プローブ法によるポリヌクレオチドの検出などを簡便で短時間かつ高感度に行う方法およびその器具に関する。

【0002】

【従来の技術】 臨床検査、獣医臨床検査、法医学検査、食品検査、環境汚染検査などの分野では検体中に微量に存在する物質を同定する方法として酵素免疫測定法や DNA プローブ法、および酵素活性測定法などが用いられている。これらの方法は標的物質を正確に同定できるばかりでなく、極微量なレベル（ 10^{-12} ～ 10^{-15} モル）まで検出する事が可能である。たとえば競合的酵素免疫測定法の場合はポリスチレンビーズ、マイクロタイタープレート、試験管などの固相表面に抗体または抗原を固定化し、固相表面に一定量の検体液を加えたのち、抗原酵素複合体または抗体酵素複合体を加える。固相表面に抗体を固定化した場合は、検体中の抗原と抗原酵素複合体とが抗体との結合をめぐって競合を始め、固相表面に抗原を固定化した場合には検体中の抗原と固相表面に固定化された抗原とが抗体酵素複合体との結合をめぐって競合を始める。一定時間経過後、固定化抗体と未結合の抗原および抗原酵素複合体もしくは固定化抗原及び検体中の抗原と未結合の抗体酵素複合体および抗体酵素複合体と未結合の抗原とを洗浄液を用いて洗浄除去する。このときの洗浄としては、洗浄液を固相部に満たした後、該洗浄液を捨て、再び固相部に洗浄液を満たして捨てるといった洗浄操作を通常 4～10 回繰り返す。この操作を一般に B/F 分離（Bind/Free 分離）と呼び、酵素免疫測定法を原理とする検査では必須の操作である。最後に酵素に対する発色基質液を固相部に加えて残存する酵素を発色させる。このとき用いる酵素はペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどが一般的である。発色に用いる基質はそれぞれの酵素に適合したものをを用いる。検体液中に標的となる抗原が多く存在すれば残存する抗原酵素複合体あるいは抗体酵素複合体の量が減り、結果として発色強度が弱くなる。発色強度は一般に比色計を用いて測定する。また、サンドイッチ酵素免疫測定法では抗体を固相表面に固定化し、固相表面に検体液を加える。一定時間経過後、固相表面の抗体に未結合の抗原を洗浄除去する。次いで抗体酵素複合体を一定量加える。ちょうど抗原が抗体に挟まれたような形となる。一定時間経過後、固相表面の抗原と未結合の抗体酵素複合体を洗浄除去したのち、該固相表面に発色基質液を加えて発色させる。この発色強度を測定することにより、検体液中の抗原濃度を定量することが可能となる。酵素活性の高低を測定することにより、検体中の酵素活性阻害物質あるいは酵素の基質量を測定する方法がある。例えばコリンエステラーゼ活性阻害測定法は、一定量のコリンエステラーゼを試験管に取り、検体液を加えて一定時間保温し、これに発色基質を加える。検体液中にコリンエステラーゼ活性阻害物質（カルバメート系農薬や有機リン系農薬など）が存在すれば発色が薄くなる。発色強度を測定することにより、検体中の酵素活性阻害物質あるいは酵素の

基質量を測定することができる。ポリヌクレオチドの検出法を利用する分野としては、病原微生物などの菌種の同定、法医学におけるDNA鑑定などがある。標的となるポリヌクレオチドと融合しうるポリヌクレオチドを作製し、これを酵素などで標識する。この標識ポリヌクレオチドと標的となるポリヌクレオチドを融合させる。これを電気泳動法で融合したポリヌクレオチドと未反応のポリヌクレオチドを分離し、ニトロセルロースメンブランに転写させる。ニトロセルロースメンブランを酵素の発色基質液に浸して発色の有無を見る。融合されたポリヌクレオチドの分子量の位置に発色が認められれば、標的となるポリヌクレオチドが存在していることが確認できる。

【0003】上述したように従来の酵素免疫法、サンドイッチ酵素免疫法、ポリヌクレオチドの検出法（以下DNAプローブ法とよぶ）は、試験管、マイクロタイタープレート、メンブランフィルター、ビーズなどの固相表面に抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドなどを固定化したのち、ついで該固定化物質と親和性のある物質を結合せしめ、該固相表面と結合していないものをB/F分離したのち、該固相に発色物質を加えて、発色させることにより、検体液中の目的物質を検出するものである。しかしながら、これらの方法では固相表面の物質と検体中の物質との結合に10分間～1時間以上もかかり、しかも、B/F分離における洗浄作業も繰り返し行う必要があって、これにも相当の時間がかかり、多くの検体を処理するには極めて時間と労力がかかるといった欠点がある。このため、操作法を簡便化し、短時間で検出可能な器具もいくつか開発されている。たとえばあらかじめフィルター上に直接抗体を結合しておき、このフィルター上で検体液と抗原酵素複合体を染み込ませながら反応させ、その後、発色基質液を加えて発色の有無を目視する方法である。しかしながら、この方法では、各検出対象物質毎に当該物質に親和性のある抗体を結合したフィルターを用いなければならず、しかもフィルター上に抗体を結合させるには特殊な専用機器が必要である上、抗体が結合したフィルターは空気や湿気の影響を受けないように特別な包装を必要とする。また、簡便な検査器具として検査キットが開発、市販されているが該検査キットも検出対象となる物質ごとにキット化されている場合が多く、一つの検体について多くの検出対象物質を検査したい場合、検出対象物質毎のキットを用意する必要があり、しかもキットを構成する試薬類は厳密に検出対象物質毎にきめられており、別々の試薬瓶に納められているので、使用者は混同しないように注意を払わなければならない。また、家畜、作物、養殖魚類の出荷に際しては残留薬剤のチェックが必要であるが、検査に手間がかかることから、検査結果が得られた時にはすでに流通してしまっている場合が多い。また、食中毒菌の検査も同様で、生産現場ですばやく検査を行い、出荷可

能か否かの判定をしなければならない。こうした現場では、標的物質の検出の為に迅速、正確、かつ安価な検査法が強く求められており、従来の技術ではある程度正確で迅速な検出器具はいくつか開発されているが、製造コストがかかるため、日常的な検査に大量使用できるまでに至っていないのが現状である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は従来の検出法の有する欠点すなわち、検出に長時間を要すること、検出対象物質ごとに検出用器具を準備しなければならないことといった欠点を改良するべく鋭意研究した。その結果、ガラス繊維、セルロース系繊維または合成繊維の表面に特定の官能基を導入した後、抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドを固定化した微小担体および該微小担体を用いた検出方法が従来の検出方法、器具の欠点を改善することができることを見出し、この知見に基づき本発明を完成した。以上の記述から明らかなように本発明は検査時間の短縮に有効である抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドが固定化された微小担体を提供すること及び該微小担体を用いた検査方法を提供すること、及び該微小担体、該微小担体表面に固定化された物質と親和性を有する物質とを内封した容器、発色基質を入れた容器および該微小担体を捕捉しうるフィルターとからなる、操作ミスを減らし、操作の簡便な検査用キットを提供することである。

【課題を解決するための手段】本発明は下記の構成を有する。

（１）微粉碎されたガラス繊維、セルロース系繊維または合成繊維の表面に抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドが固定化された微小担体。

（２）前記第１項記載の微小担体と親和性を有する少なくとも１つの物質に酵素あるいは放射性同位体あるいは蛍光物質を結合させた物質と前記第１項記載の微小担体との相互作用を利用することにより、標的物質を検出する方法。

（３）微小担体に固定化された酵素と該酵素に対する基質との相互作用を利用することにより標的物質を検出する方法。

（４）抗体もしくは抗原が固定化された前記第１項記載の微小担体および抗原酵素複合体もしくは抗体酵素複合体に検体液を加えて競合的酵素免疫反応を行い、ついで該微小担体と未結合の抗原酵素複合体もしくは抗体酵素複合体とを分離し、該微小担体に発色基質液を滴下する事により、発色の有無を確認し、検体液中に抗体と特異的に結合する物質が存在するか否かを検出する方法。

（５）抗体が固定化された微小担体および抗体酵素複合体に検体液を加えてサンドイッチ酵素免疫反応を行い、ついで該微小担体と遊離の抗体酵素複合体とを分離し、該微小担体に発色基質液を滴下する事により発色の有無を確認し、検体液に抗体と特異的に結合する物質が存在

するか否かを検出する方法。

(6) 微小担体表面に酵素が固定化された前記第 1 項記載の微小担体に検体液および発色基質液を加え、ついで該微小担体をフィルターでろ過し、フィルター上の微小担体表面の発色の有無を確認し、検体液に標的物質が存在するか否かを検出する方法。

(7) 標的ポリヌクレオチドに対し塩基結合部位の異なる 2 種のポリヌクレオチドのうちの 1 種が固定化された前記第 1 項記載の微小担体と、酵素標識したもう一方のポリヌクレオチドとに検体液を加えて標的ヌクレオチドと融合させたのち、該微小担体をろ過して融合されていない酵素標識ポリヌクレオチドを除去し、ついで該微小担体に発色基質液を滴下する事により発色の有無を確認し、検体液中に認識されるべき配列のポリヌクレオチドが存在するか否かを検出する方法。

(8) 前記第 1 項で示した微小担体、該微小担体表面に固定化された物質と親和性を有する物質とを内封した容器、発色基質を入れた容器および該微小担体を捕捉するフィルターとからなる検査用キット

【0005】本発明は、多孔性でなく比表面積の大きい微小担体の表面に官能基が導入され、ついで該表面に抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドが固定化された微小担体、該微小担体を用いることにより、微小担体表面に固定化された物質と親和性のある物質とが結合するのに要する時間を短くして、また未結合の物質を速やかに除去して短時間に検査を完了する検査方法、及び該微小担体および該微小担体の表面に固定化された物質と親和性を有する物質とを一つの容器に内封する事により、使用者の操作ミスを極力減らし、かつ操作を簡便化した検査用キットである。

【0006】本発明で用いる比表面積の大きな微小担体としては、多孔性でない微小担体なら特に制限はなく、例えば、セルロース繊維、ニトロセルロース繊維、酢酸セルロース繊維、ガラス繊維、ナイロン繊維もしくはポリプロピレン繊維などを粉砕機等で微粉砕してつくられた微小担体などをあげることができ、直径 0.5 μm ~ 10 μm 、長さ 5 ~ 20 μm の微小担体が適当である。また従来のクロマトグラフィー担体と異なり、微小担体は多孔性でない方が B/F 分離を容易にするとともに微小担体への酵素標識物の非特異的吸着が軽減されるので好ましい。

【0007】本発明の微小担体は次の方法により得ることができる。すなわち、まず最初に微小担体にアミノ基、カルボキシル基、ホルミル基、イオン交換基もしくは疎水基などの官能基を導入する。この導入方法は従来から知られているものでよい。例えば、セルロース繊維を用いた微小担体の場合、1 重量%の水酸化ナトリウム水溶液中でエピクロルヒドリンを作用させてエポキシ活性化後、アンモニア水を加えてアミノ化する。ガラス繊維を用いた微小担体の場合はアミノアルキルシランを水

を含むアルコール中に浸漬し、120℃で乾燥することによりアミノ基が導入できる。また、カルボキシル基を導入するにはアミノ化された担体を無水コハク酸と pH 8.0 前後で作用させることによりカルボキシル基が導入できる。また、アミノ基が導入された微小担体を pH 5.0 前後でグルタルアルデヒドと作用させることによりホルミル基を導入できる。ジエチルアミノエチル基 (DEAE 基) やカルボキシメチル基 (CM 基) を導入したセルロースの微小担体は市販されており、たとえばワットマン社製 DEAE セルロース (商標) や CM セルロース (商標) がそのまま利用可能である。ニトロセルロース繊維、ポリプロピレン繊維またはナイロン繊維は繊維自体の疎水性を利用できるので特に疎水基を導入する必要はなく、これらの繊維を粉砕してそのまま利用できる。またセルロース繊維に疎水基を導入するには、例えば 3 フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体を触媒としてフェニルグリシジルエーテルあるいは炭素鎖 3 以上のアルキルグリシジルエーテルを作用させることにより疎水基を導入することができる。

【0008】ついでこれら官能基が導入された微小担体に抗体、抗原、酵素、もしくはポリヌクレオチドを固定化する。このとき、例えばカルボキシル基を有する抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドを固定化する場合にはアミノ基を導入した微小担体を用いることが適当であり、カルボジイミドを用いてペプチド結合を形成させ固定化する。アミノ基を有する抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドを固定化する場合にはカルボキシル基もしくはホルミル基を導入した微小担体を用いることが適当であり、カルボキシル基を導入した微小担体に抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドを固定化する場合には、カルボジイミドを用いてペプチド結合を形成させ固定化する。ホルミル基を導入した微小担体を用いる場合は pH 8 前後のアミノ基を含まない緩衝液中で該微小担体と抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドを混合して固定化する。この溶液に水素化ホウ素ナトリウムを加えても良い。ポリヌクレオチドの固定化には静電氣的結合を利用する場合が多く、イオン交換基例えば DEAE 基 (ジエチルアミノエチル基) やカルボキシメチル基などを導入した微小担体を用いることが適当である。通常中性付近の緩衝液中で固定化を行う。また、疎水基としてはフェニル基あるいは炭素鎖が 3 以上のアルキル基などがあり、疎水基は膜蛋白の固定に特に有効である。通常 Ca^{2+} 、 Li^{+} 、 NH_4^{+} 、 SCN^{-} 等のカオトロピックイオンを含まない中性付近の緩衝液中で行うがこれに限定されるものではない。また、該微小担体に抗体、抗原、酵素、もしくはポリヌクレオチドを固定化する時は通常 4℃から室温下、4 ~ 18 時間かけて行う。

【0009】微小担体に固定化する抗原としては抗菌性を有する生理活性物質、例えばペニシリン、アンピシリ

ン、セファロスポリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、フラジオマイシン、デストマイシン、カスガマイシン、タイロシン、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、スピラマイシン、リンコマイシン、コリスチン、バシトラシン、サリノマイシン、モネンシン、ラサロシド、テトラサイクリン、及びその類縁物質、クロラムフェニコール、パージニアマイシン等があげられ、合成抗菌剤としてはサルファ剤、オキシリン酸、ナリジクス酸、ピロミド酸、フラゾリドン、ジフラゾン等があげられ、天然毒素全般としてはアフマトキシン、T2トキシン、ゼアラレノン、デオキシニバレノール、ニバレノール、パツリン、フモニシン、HT-2、オクラトキシン、テトロドトキシン、オカダ酸、サキシトキシン、ゴニオトキシン、ボツリヌス毒素等があげられ、合成化学製品としては農薬全般、例えばダイオキシシン、2, 4-D、ベノミル、アルディカルブ、カルボフラン、メソミル、DDVP、馬拉ソン、パラコート、ダイアジノン、フェニトロチオン、エンドリン、アルドリノ、ヘプタクロル等があげられ、その他の合成化学製品としてはPCB、TNT、ベンゼン等があげられる。また、生体化学物質全般としてはヘモグロビン、 α -フェトプロテイン、免疫グロブリン、アルブミン、アンチトロンビン、トロンビン、プラスミノゲン、フェリチン、チログロブリン、ゼラチン、コレステロール、テストステロン、コルチコステロン、プロゲステロン、エルゴステロール、エストラジオール、チトクロムC、アドレナリン、各種ビタミン、HBs抗原、HIV抗原、インシュリン、プロテインA、コリンエステラーゼ、アミラーゼ、ペプシンなどがあげられるがこれに制限されるものではない。固定化する抗体としては上述の抗原に対する抗体があげられる。該抗体は例えば上述の抗原を免疫動物例えばラット、モルモット、ウサギ、マウス、山羊、羊、馬、牛等のほ乳動物に免疫して得るか、マウスに免疫後そのリンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体として得られる。固定化する酵素としては、例えばコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ等があげられる。固定化するポリヌクレオチドとしては例えば炭疽菌に固有のリボソームRNAの塩基配列と相補する少なくとも一本のポリヌクレオチド化1等があげられる。

【0010】微小担体を分離するためには通常フィルターを用いるのが一般的であるが、かかるフィルターとしてはセルロース濾紙、ガラス繊維濾紙など微小担体を通過しないでかつ通液性の良いものであればとくに制限はない。

【0011】本発明の競合的酵素免疫法を利用する検出方法にあつては、一般に抗体もしくは検出対照物質を固定化した微小担体を用い、サンドイッチ酵素免疫法を利用する検出方法にあつては抗体を固定化した微小担体を

用いる。DNAプローブ法による特定のオリゴヌクレオチドを検出する場合は該ポリヌクレオチドと相補するDNAプローブを固定化した微小担体を用い、酵素活性の測定をする場合は、酵素を固定化した担体を用いる。

(以下、これらを物質固定化担体という。)本発明の検出方法にあつては該物質固定化担体とその物質に親和性を有する物質、たとえば、酵素標識抗体、酵素標識抗原または酵素標識ポリヌクレオチドと検体液を加え、ついで発色基質液を滴下して、発色を確認する。また、該物質固定化担体と該酵素標識抗体、該酵素標識抗原または該酵素標識ポリヌクレオチドを容器に置いて用いたり、凍結乾燥状態で内封したものを用いることができる。標識に用いられる酵素は、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、リゾチームなど一般的に用いられるものでよい。

【0012】次に、本発明の検出方法を詳述する。物質固定化担体と酵素標識抗体、酵素標識抗原もしくは酵素標識ポリヌクレオチドを容器にいれ、ついで該容器内に検体液を一定量加えて1~40分間、4~37℃で保温する。この間に物質固定化担体表面の固定化された物質と親和性を有する物質とが急速に結合する。次に容器中の全量を前述のフィルターに滴下する。全量が完全に当該フィルターに染み込んだ後、洗浄液を一滴(約50 μ l)滴下する。洗浄液は0.02重量%~0.1重量%のTween 20(商標)(ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)水溶液あるいは0.5重量%~1重量%のTween 80(商標)(ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート)水溶液が適当である。洗浄はこの操作のみで終了する。多孔性を有しない微小担体のため担体内部に酵素標識物等が入り込むことがなく簡単に洗い流せる。

【0013】微小担体に固定化された物質と結合した当該物質を検出する方法は、酵素に対する発色基質を用いる。たとえば酵素がペルオキシダーゼの場合は、2, 2'-アジノジー(3-エチルベンズチアゾリン)-6-スルホン酸、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン、4-クロロ-1-ナフトールなどが適当である。

【0014】10ppm~400ppmの濃度に調製した当該発色基質は前述のフィルター上に滴下する。1分~5分経過後に発色の有無が確認できる。

【0015】物質固定化担体の作製およびこれに付随する酵素標識物や発色基質はあらかじめ調製して安定な条件下、例えば、凍結乾燥し、4℃~8℃で保存すれば長期保存および即時使用可能となる。検査用キットは上記の条件で調製した物質固定化担体およびこれに付随する酵素標識物ならびに発色基質をセットにしたものからなる。キットは上述の方法と同様の方法で使用する。

【0016】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に

に説明する。

【0017】実施例 1

ホルミル化微小担体の作製

微小担体としてアドバンテック社製 (GB-100) もしくはワットマン社製 (GF/C) のガラス繊維濾紙を乳鉢で粉碎して、直径約 $1\mu\text{m}$ 前後、長さ約 $5\sim 10\mu\text{m}$ 程度の粉碎品を調製した。該微粉碎品 1g を 0.5 重量% アミノプロピルトリエトキシシラン (シグマ社製) 50 重量% エタノール溶液 10ml に浸漬し、 120°C で 2 時間乾燥させ、該微粉碎品の表面にアミノ基を導入し、アミノ化ガラス微小担体を調製した。アミノ基の導入量はおよそ $100\mu\text{mol}/\text{mg}$ であった。次に該アミノ化ガラス微小担体を 10ml の生理食塩水に懸濁し、 25 重量% グルタルアルデヒド水溶液を $100\mu\text{l}$ 加えて室温で 2 時間攪拌しながら反応させた。反応終了後、生理食塩水 100ml で 5 回洗浄して、ホルミル化ガラス微小担体を得た。

【0018】抗原の作製法

サルファジメトキシシン (シグマ社製) 0.1 ミリモルをメタノール 1ml に溶解し、氷冷下、濃塩酸を $50\mu\text{l}$ 加えた。 5 重量% 硝酸ナトリウム水溶液を $200\mu\text{l}$ 滴下してジアゾ化した。牛血清アルブミン (以下 BSA という) (シグマ社製) 132mg を 0.2M 炭酸ナトリウム 4ml に溶解し、調製したジアゾ化サルファジメトキシシンに全量滴下した。全量滴下後、 2 時間、 4°C で反応を続けた。セルロファイン GH-25 (商標) (チッソ製) で脱塩して、未反応物とサルファジメトキシシン-BSA 複合体とを分離した。精製された当該複合体は、凍結乾燥して 4°C で保存した。

【0019】抗サルファジメトキシシン抗体の作製法

得られた抗原を $1\text{mg}/\text{ml}$ となるように生理食塩水に溶解し、フロインドのアジュバンドとして家兎 (白色和種) に 2 週間間隔で皮下注射した。力価が 10000 程度に上昇した時点で全採血を行い、血清画分 100ml を得た。

【0020】抗血清の精製

該血清画分 1 部に対して生理食塩水 1 部と硫酸アンモニウム 1 部 ($\text{pH} 7.2$) とを添加し、 4°C で 30 分間静置後、 10000rpm 、 10 分間遠心して得られた沈澱部分を抗体画分とした。

【0021】抗体の固定化法

抗体画分を 0.1M リン酸バッファー ($\text{pH} 8.0$) で希釈し、濃度を蛋白量として $100\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した。この溶液 1ml に対して上述のホルミル化ガラス微小担体を 50mg 加えて 4°C で 18 時間、攪拌しながら反応させて、抗体が固定化された微小担体を得た。

【0022】サルファジメトキシシン-ペルオキシダーゼ複合体の作製法

西洋わさびペルオキシダーゼ (和光製) 10mg に 4M 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を $10\mu\text{l}$ 加え、暗所で

2 時間静置後、 20mM のグリセロールを添加した。生理食塩水で平衡化したセルロファイン GH-25 (商標) (チッソ製) で脱塩、バッファー置換を行った。過ヨウ素酸化されたペルオキシダーゼ 5mg にサルファジメトキシシン (シグマ社製) 100mg を加え、さらに水素化シアノホウ素ナトリウム (シグマ社製) 3mg を加え、 4°C で 18 時間反応させた。未反応のサルファジメトキシシンと複合体との分離はセルロファイン GH-25 で行った。

【0023】上述の抗体が固定化された微小担体 0.3mg を 1ml の生理食塩水に懸濁させて $0.3\text{mg}/\text{ml}$ のスラリーとした。ペルオキシダーゼ量として 5ng のサルファジメトキシシン-ペルオキシダーゼ複合体溶液と 1ml の生理食塩水溶液とを混合した溶液を、あらかじめ 40°C に冷却した容量約 2ml の遠心チューブ (エッペンドルフ社製) 内に $50\mu\text{l}$ 加えて凍結させた。次に上述のスラリーを $50\mu\text{l}$ 重層して凍結した。遠心チューブを凍結乾燥機に入れて内容物を乾燥させた。使用まで 4°C で保存した。

【0024】検体液の調製

鶏卵に等量のメタノールを加えてホモジナイズした後、ろ過して抽出液を得た。抽出液は生理食塩水で 2 倍に希釈した。これを検体液とした。

【0025】上記で調製した検体液 $50\mu\text{l}$ を先に作製した当該遠心チューブ内に加えて軽く振とうした。 3 分間室温で静置後、チューブの内容物を全量、セルロース濾紙に滴下した。全量が濾紙に染み込んだ後、直ちに 0.05 重量% Tween 20 (商標) 水溶液を約 $50\mu\text{l}$ 滴下した。全量が染み込んだ後、過酸化水素を含む 4 -クロロ-1ナフトール溶液を $50\mu\text{l}$ 滴下した。加えた時点から 5 分経過後に当該濾紙に生じる円形の青紫色の発色を確認した。

【0026】この発色が認められたことにより、サルファジメトキシシンが鶏卵中に含まれていないことが判明した。鶏卵中にサルファジメトキシシンが約 50ppb のレベルで存在すると、当該濾紙に発色は認められなかった。鶏卵からの抽出と測定時間を合わせて 20 分以内で検査は終了した。

【0027】比較例 1

従来法のマイクロタイタープレートに抗体を固定化して検査する方法を行った。すなわち実施例 1 に準じて作製した抗体画分を 0.1M 炭酸水素ナトリウム水溶液で $10\text{ng}/\text{ml}$ に調製し、これを $100\mu\text{l}$ ずつ 96 穴ポリスチレン製平底マイクロタイタープレート (ヌンク製) に加えて 4°C で 18 時間保温した。保温後、 0.05 重量% の Tween 20 (商標) 水溶液で 5 回洗浄して未結合の抗体を除去した。 3 重量% のオブアルブミン水溶液を各ウェルに $400\mu\text{l}$ ずつ加えて 37°C で 1 時間保温してブロッキングを行った。先に調製した抗体を固定化したマイクロタイタープレートに該検体液を 50

μ l ずつ加えた。また、あらかじめサルファジメトキシンを生理食塩水で 5 p p b、10 p p b、100 p p b、1000 p p b となるように調製した標準液についても、同様に抗体を固定化したマイクロタイタープレートに 50 μ l ずつ加えた。次に先に調製したサルファジメトキシナーペルオキシダーゼ複合体溶液を 50 μ l ずつ該マイクロタイタープレートに加えて混和し、37℃で1時間保温した後、0.05重量%の Tween 20 水溶液で10回洗浄した。次に酵素の基質として過酸化水素を含む 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン溶液を 100 μ l ずつ該マイクロタイタープレートに加えて室温で30分間放置して発色させた。30分間経過後 5.0M 硫酸を 50 μ l ずつ加えて発色を停止させ、生じた色の濃さを吸収波長 450 nm に調整したマイクロプレートリーダー（バイオラット製）で測定した。測定された吸光度と標準液の濃度の対数値をグラフにプロットする事で得られた検量線から検体液中のサルファジメトキシンを求めた。この従来の方法により、鶏卵中にサルファジメトキシが存在していないことが確かめられた。鶏卵からの抽出と測定時間をあわせて100分を要した。

【0028】比較例2

三菱油化ビーシーエル製「サルファジメトキシ」キットを用いて検査を行った。すなわち、キットに付属の抽出用緩衝液を10倍に希釈した溶液 7 ml と鶏卵（液卵）1 ml をホモジナイズし、3000 rpm で10分間遠心分離後、上清を検体液とした。キットのマイクロタイタープレートに検体液 50 μ l をマイクロピペットで加え、次に酵素複合体溶液 50 μ l を加えて室温で20分間保温した。検体液とは別にキットに付属のサルファジメトキシ標準液（250 p p b、50 p p b、6.25 p p b、1.25 p p b）についても同様に行った。次にあらかじめ蒸留水で10倍に希釈したキットの洗浄液を用いて4回洗浄した。基質希釈用の溶液で基質液を100倍に希釈して調製した溶液を各ウェルに100 μ l ずつ加えて10分間室温で保温した後、反応停止液を 50 μ l ずつ加えて発色を停止させ、生じた色の濃さを吸収波長 450 nm に調整したプレートリーダーで測定した。標準液の測定結果から検量線を作成し、サルファジメトキシを定量した。鶏卵からの抽出と測定時間をあわせて約40分を要した。従来法は測定時間が長い上、ピペットによる正確な操作が繰り返し必要であり、しかも標準液を用いて毎回検量線を作成する必要があり、手間がかかる。しかし、本発明の方法ならば短時間で容易に検査可能であった。

【0029】実施例2

ポリエーテル系抗生物質であるラサロシド（シグマ社製）10 mg をジオキサン 2 ml に溶解し、実施例1に準拠して作製したアミノ化ガラス微小担体を 50 mg 加え、さらにジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）

を 10 mg 加えて室温で5時間反応させた。ジオキサンで3回洗浄後、減圧乾燥してラサロシドが固定化された微小担体を得た。このうち 10 mg を、33 ml の生理食塩水に加えて懸濁させ、0.3 mg/ml のスラリーとした。

【0030】抗原の作製法

「免疫生化学実験法」社団法人日本生化学会編の p 78 に準拠して抗原を作製した。すなわちラサロシド 100 mg をジメチルホルムアミド 20 ml に溶解し、トリ n-ブチルアミン 60 mg を加え、さらにイソブチルクロロギ酸 50 mg を加えた。ついで BSA 200 mg を溶解させた 50 重量% ジメチルホルムアミド水溶液 100 ml を加えて 4℃ で4時間反応させた。未反応物とラサロシド-BSA 複合体との分離はセルロファイン GH-25 を用いて行った。得られた複合体は凍結乾燥して保存した。

【0031】抗体の作製並びに精製

実施例1に準じて家兎に免疫して抗血清を得、精製した。

【0032】抗体-ガラクトシダーゼ複合体の作製法

「酵素免疫測定法」石川栄治ら編 p 112~p 119 に準拠して抗体-ガラクトシダーゼ複合体を作製した。すなわち抗体にマレイミド基を導入し、 β -ガラクトシダーゼ（シグマ社製）の SH 基と結合させることにより、 β -ガラクトシダーゼ標識抗体を作製した。

【0033】上記作製した標識抗体とラサロシドが固定化された微小担体のスラリーとを、実施例1の方法に準じて遠心チューブに内封した。

【0034】鶏肉に等量のメタノールを加えてホモジナイズした後、遠心分離して抽出液を得た。抽出液は生理食塩水で2倍に希釈した。これを検体液とした。

【0035】上記で調製した検体液 50 μ l を上述の遠心チューブ内に入れ軽く振とうした。3分間室温で静置後、チューブの内容物を全量、セルロース濾紙に滴下した。全量が濾紙に染み込んだ後、直ちに 0.05 重量% Tween 20（商標）水溶液を約 50 μ l 滴下した。全量が染み込んだ後、2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド溶液を 50 μ l 滴下した。加えた時点から5分経過後に当該濾紙に生じる円形の青紫色の発色を確認した。

【0036】この発色が認められたことにより、ラサロシドが鶏肉中に含まれていないことが判明した。鶏肉中にラサロシドが約 50 p p b のレベルで存在すると、当該濾紙に発色は認められなかった。鶏肉からの抽出と測定時間を合わせて20分以内で検査は終了した。

【0037】実施例3

実施例1に準拠してホルミル基を導入した微小担体を作製した。該ホルミル基を導入した微小担体に、抗サルモネラ抗血清（DIFCO 製、コード 2264-47-2）を結合させる。抗血清の精製及び担体への結合は実

施例 1 に準拠して行った。

【0038】

抗サルモネラ抗体ーペルオキシダーゼ標識物の調製
ペルオキシダーゼの糖鎖を 10 mM の過ヨウ素酸で 20℃、2 時間酸化してホルミル基を生成させた後、抗サルモネラ抗血清と 4℃、18 時間反応させることにより抗サルモネラ抗体ーペルオキシダーゼ標識物を得た。

【0039】抗サルモネラ抗体が固定化された微小担体 0.3 mg を 1 ml の生理食塩水に懸濁させてスラリーとした。ついで、上記作製した標識物と微小担体とを、実施例 1 の方法に準じて遠心チューブに内封した。

【0040】鶏肉 20 g を 160 ml の EEM 培地とともにホモジナイズし、36℃で 18 時間前培養した。培養後、その 1 ml を 9 ml のハーナテトラチオン酸塩培地に移し 42℃で 18 時間選択培養した。培養後、1 時間静置し、上澄みを得た。上澄み液を検体液とした。

【0041】上記で調製した検体液 50 μl を先に作製した当該遠心チューブ内に加えて軽く振とうした。3 分間室温で静置後、チューブの内容物を全量、セルロース濾紙に滴下した。全量が濾紙に染み込んだ後、直ちに 0.05 重量% Tween 20 (商標) 水溶液を約 50 μl 滴下した。全量が染み込んだ後、過酸化水素を含む 4-クロロ-1 ナフトール溶液を 50 μl 滴下した。加えた時点から 5 分経過後に当該濾紙に生じる円形の青紫色の発色を確認した。

【0042】発色が認められたことより、検体液中にサルモネラ菌が存在することが判明した。検体液中にサルモネラ菌が約 10⁶ 個/ml のレベルで存在すると、検出可能であった。試料として用いた鶏肉は公定法による検査でサルモネラ菌が検出されており、正しい相関がみられた。

【0043】実施例 4

実施例 1 に準拠して作製したホルミル基を導入した微小担体 10 mg にウナギ由来のコリンエステラーゼ溶液 (シグマ社製) 50 p モル/ml を 1 ml 加えて 4℃で 18 時間反応させてコリンエステラーゼ固定化担体を得た。

【0044】得られたコリンエステラーゼ固定化微小担体 0.3 mg を 1 ml の 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁させてスラリーとした。該スラリー 50 μl を遠心チューブ内に入れて凍結乾燥した。

【0045】10 p p b の濃度のカルバメート系農薬のカルボフラン (サイエンスコーポレーション製) 水溶液 50 μl を、上記の遠心チューブ内に加えて軽く振とう後、室温で 3 分間静置した。対照として蒸留水についても同様に行った。

【0046】チューブの内容物を全量、セルロース濾紙に滴下した。ついで、酢酸インドキシル溶液を 50 μl 滴下した。加えた時点から 5 分経過後、蒸留水の場合、当該濾紙には青色の発色が見られ、カルボフランを含ん

だ水には発色が認められなかった。発色が認められなかったことより、10 p p b のカルボフランはコリンエステラーゼ活性をほぼ 100% 阻害したことが判明した。検査時間は約 10 分であった。

【0047】実施例 5

微小担体として実施例 1 に準拠して作製したホルミル基を導入した微小担体を用いた。

【0048】10 μ モル/ml のグルコースオキシダーゼ溶液 (シグマ社製) 1 ml に上記の微小担体を 10 ~ 50 mg 加えて、4℃で 18 時間反応させた。

【0049】得られたグルコースオキシダーゼが固定化された微小担体 0.3 mg を生理食塩水 1 ml に懸濁させてスラリーとした。該スラリー 50 μl を遠心チューブ内に加えた。また、1 μ モル/ml のペルオキシダーゼ溶液 50 μl と 0.5 mg/ml の 4-クロロ-1 ナフトール溶液 50 μl とを該チューブ内に加え、凍結乾燥した。

【0050】ヒト血漿 50 μl を上記遠心チューブ内に加えて軽く振とうした。

【0051】直ちにチューブの内容物全量をセルロース濾紙に滴下した。5 分経過後、10 重量% アジ化ナトリウム水溶液を滴下して反応を止めた。該濾紙上に生じる円形の青紫色の発色を確認した。本方法では試料の血中グルコース濃度が 20 mg/ml を越えたとき発色が認められた。該血漿は従来の酵素法により、25 mg/ml のグルコースが存在することが確認され、正しい相関があることを示していた。

【0052】実施例 6

炭疽菌の mRNA の一部の塩基配列と相補する 10 塩基以上のポリヌクレオチド (以下 DNA プローブと呼ぶ) を 2 種類用意した。作製は、ジャーナルオブクリニカル微生物学 (Journal of Clinical Microbiology), 31 巻, p 547-551, 1993 に準拠した。すなわち、DNA 合成器 (アプライドバイオシステムズ社製) で 2 種の合成ヌクレオチド (DNA プローブ) 化 1 を作製し、C18 逆相カラム (東ソー製) で精製した。2 種の DNA プローブはそれぞれ炭疽菌の mRNA の異なる塩基配列と相補するように作られたものを用いた。

【0053】微小担体としては DEAE セルロース (商標) (和光製) を用いた。該 DNA プローブの生理食塩水溶液 (10 μ g/ml) 10 ml に DEAE セルロース 100 mg を加え 4℃で 24 時間反応させ、DNA プローブ固定化微小担体を作製した。

【0054】もう一方の該 DNA プローブにフォトビオチン (商標) (ベクター社製) を標識した。方法は「日本臨床」50 巻, 1992 年特別号, p 385 に記載されている方法に準拠した。すなわち 0.5 mg/ml の DNA プローブ溶液 10 μl に 5 μl のフォトビオチンを加えて氷冷下電灯の光を照射した後、ブタノールを用

いて未反応のビオチンを遠心除去してビオチン標識DNAプローブを得た。

【0055】上記で作製したDNAプローブ固定化微小担体とビオチン標識DNAプローブを実施例1に準拠して遠心チューブに内封した。

【0056】炭疽菌が 10^8 個/gとなるように炭疽菌を添加した豚肉25gと無添加の豚肉各々に225mlの蒸留水を加えてホモジナイズ後、ポリミキシン加トリプトケースソイブイオン培地を用いて選択増菌培養を行い、検体液を作製した。

【0057】リゾチームが10mg、トリス塩酸塩50ミリモル、EDTA5ミリモル、塩化ナトリウム50ミリモル/mlの緩衝液(pH8.0)2mlに該検体液1mlを懸濁して37℃で90分溶菌を行い、溶菌液を作製した。

【0058】溶菌液50 μ lを当該遠心チューブ内に加え、42℃で30分間保温して融合させたのち、アビジン標識ペルオキシダーゼ(E・Yラボラトリーズ製)5 μ g/ml生理食塩水溶液を100 μ l加えて軽く振とう後、室温で5分間静置した。

【0059】チューブの内容物を全量セルロース濾紙に滴下した。全量がフィルターに染み込んだ後、直ちに0.05重量%Tween20(商標)水溶液を約50 μ l当該濾紙に滴下した。全量が染み込んだ後、過酸化水素を含む4-クロロ-1ナフトール溶液を50 μ l滴

下した。炭疽菌を添加した豚肉の検体液は加えた時点から5分経過後に当該濾紙に円形に生じる青紫色の発色が認められた。無添加の豚肉には発色は認められなかった。

【0060】発色が認められたことより、炭疽菌を添加した豚肉には炭疽菌が存在していることが示された。また、同時に行った公定法による検査でも炭疽菌を添加した豚肉には炭疽菌が検出されており、炭疽菌無添加の豚肉では検出されなかった。従って本方法は公定法と正しい相関があることを示している。要する時間は検体液作製後から検出までに約40分であった。

【0061】

【発明の効果】本発明の検査方法は、抗体、抗原、酵素もしくはポリヌクレオチドが表面に固定化された微小担体を用いることにより、微小担体表面に固定化された物質と親和性のある物質とが結合するのに要する時間を短くし、また未結合の物質を速やかに除去して短時間に検査を完了することができる。また、本発明のキットは該微小担体の表面に固定化された物質と親和性を有する物質および該微小担体とを一つの容器に内封する事により、使用者の操作ミスを極力減らし、かつ操作を簡便化し、しかも特殊な機器、包装を必要としないので、安価に作製することができる。

【0062】

【化1】

5' > GCTGATCTTGACTATGTGGGTG < 3'

5' > GGCTCAGGATCTGTCCTTCGG < 3'